

Attach #9

**SEPARATION OF OLIGOMANNURONIC ACID ACCORDING TO  
POLYMERIZATION DEGREE**

Patent Number: JP6172375  
Publication date: 1994-06-21  
Inventor(s): TAKEUCHI TOSHIO; others: 03  
Applicant(s): KIBUN FOOD CHEMIFA CO LTD; others: 01  
Requested Patent: ☐ JP6172375  
Application Number: JP19920325289 19921204  
Priority Number(s):  
IPC Classification: C07H1/06; B01D15/04; B01D15/08; B01J41/06  
EC Classification:  
Equivalents: JP3202365B2

**Abstract**

**PURPOSE:** To efficiently separate oligomannuronic acids according to polymerization degree by treating a mixture of the oligomannuronic acids different in polymerization degree by the anion-exchange chromatography using a bicarbonate compound solution as an elute.

**CONSTITUTION:** A mixture of oligomannuronic acids different in polymerization degree is subjected to anion-exchange chromatography treatment using a bicarbonate compound solution as an elute to separate the oligomannuronic acids according to the polymerization degree. Specifically, alginic acid is decomposed in the presence of polyglucuronic acid lyase contained in alginolytic enzymes derived from *Flavobacterium-multiborum* K-11 (FERM-P-1138) to obtain polymannuronic acid. The resultant polymannuronic acid is subsequently decomposed in the presence of polymannuronic acid lyase derived from an abalone- acetone powder to obtain an oligomannuronic acid mixture. The obtained mixture is then dissolved in an ammonium bicarbonate solution, adsorbed on an anion-exchange resin and subsequently eluted by a linear concentration gradient of an ammonium bicarbonate solution.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

(19)日本特許庁(JP)

(12)公開特許公報(A)

(11)特許公開番号

特開平6-172375

(43)公開日 平成6年(1994)6月21日

(51)Int.Cl. <sup>4</sup>	識別記号	庁外公開番号	FI	技術表示箇所
C07H 1/06				
B01D 15/04				
	15/08			
B01J 41/08				
#C07H 7/083				

審査請求 未請求 請求項の数1(全 4 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願平1-325289	(71)出願人	000141510 株式会社紀文フードミファ 東京都港区新橋3丁目2番5号
(22)出願日	平成4年(1992)12月4日	(71)出願人	000141509 株式会社紀文食品 東京都中央区銀座7丁目14番13号
		(72)発明者	竹内 秀男 東京都町田市山手町1-4-6 ハイック 米川404
		(72)発明者	山下 功 茨城県新治郡北条村大字男神239-55
		(74)代理人	弁護士 湯浅 昌二 (外6名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 オリゴマンヌロン酸重合度によって分離する方法

例【要約】

【目的】本発明は、オリゴマンヌロン酸混合物を、重合度別に分離することを目的とする。

【構成】オリゴマンヌロン酸混合物を、重炭酸化合物溶液を溶出液とする陰イオン交換クロマトグラフィーを行うことにより分離する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】オリゴマンヌロン酸を重合度によって分離する方法であって、重合度の異なるオリゴマンヌロン酸混合物を、重炭酸化合物を溶出液とする陰イオン交換クロマトグラフィーを行うことにより分離することを特徴とする方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、オリゴマンヌロン酸を重合度によって分離する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】近年、自然界に見いだされる多糖類の分解に様々な生理活性のあることが発見されており、例えば、ペクチンの分解には、植物の生長を促進する活性や、抗菌活性があることが知られており、また、キチン、キトサンの分解物に抗菌活性のあることが認められている。また、アルギン酸の分解物には、人体の腸内における有用細菌であるビフィズス菌の増殖活性が認められている。

【0003】このようなことから、アルギン酸の分解生成物のひとつであるオリゴマンヌロン酸についても、有用な生理活性を有することが期待されている。また構造既知のオリゴマンヌロン酸は、生理活性物質の作用メカニズムの解明やアルギン酸の構造解明の手掛かりとしても非常に有用な物質である。

【0004】アルギン酸はグルロン酸およびマンヌロン酸が1,4-結合したポリマーであり、ポリグルロン酸（以下ポリGという）、ポリマンヌロン酸（以下ポリMという）、グルロン酸マンヌロン酸交互に連なるポリマー（以下ポリMGという）の3つのブロックからなる共重合体である。

【0005】アルギン酸の分解方法としては、従来は加水分解法が用いられていたが、操作が煩雑であり、収率が低いという欠点があった。これに対し、最近、酵素を用いて穏やかな条件下で行う方法が開発された。アルギン酸を分解する酵素は、フラボバクテリウム属菌、シュウドモナス属菌（特開昭59-143597）およびアルテロモナス属菌（特開昭63-214192）等の培養液から得られることが知られている。

【0006】アルギン酸を分解する酵素には、ポリグルロン酸リアーゼ（Gase）、ポリマンヌロン酸リアーゼ（Mase）およびポリマンヌロン酸グルロン酸リアーゼ（MGase）とがあり、それぞれ異なる基質特異性を有している。GaseはポリGおよびポリMGを分解するがポリMを分解せず、MaseはポリMおよびポリMGを分解するがポリGを分解せず、MGaseはポリM、ポリGおよびポリMGのいずれも分解することができる。

【0007】上述のようにして得られたオリゴマンヌロン酸は、構造研究等の特定の目的のためには、その重合度によって分離する必要がある。従来、オリゴマンヌ

ロン酸を重合度によって分離した例は少なく、主としてゲル濾過法が用いられている。一般的にゲル濾過は、1回の処理量に制限があり、回収効率も低い。一方、陰イオン交換クロマトグラフィーを用いた例も報告されているが、精製効率が悪く、工業的な生産方法としては通していない。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】以上のことから本発明は、オリゴマンヌロン酸の重合度別分離を効率良く行う方法を開発することを目的とする。

【0009】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記の目的を達成するために鋭意研究した結果、重炭酸化合物を溶出液として用いた陰イオン交換クロマトグラフィーを行うことにより、重合度の異なるオリゴマンヌロン酸の混合物から、効率良くオリゴマンヌロンを重合度別に分離しうることを見だし、本発明を完成するに至った。

【0010】本発明において用いられるオリゴマンヌロン酸混合物は、例えば、アルギン酸を加水分解するか、または上述のアルギン酸分解酵素を用いて分解することにより得ることができる。オリゴMは不飽和二重結合を含んでいてもよい。

【0011】酵素としては周知のMaseまたはMGaseのいずれをも用いることができる。例えば、*Flavobacterium*（ジャーナル・オブ・バクテリオロジー 194:9894）、*Baillietia*（アプライド・アンド・エンバイロメンタル・マイクロバイオロジー 44:747B）、海洋性軟体動物（*Littorina* 肝、バイオキミカ・エト・バイオフィジカ 88: 618B）、海洋性軟体動物（*Diplommatina* ザ・ジャーナル・オブ・バイオケミストリー 61:80, 92）等に由来するMaseが一般に知られている。

【0012】次に本発明によるオリゴM混合物の分画および精製方法について説明する。

【0013】オリゴM混合物を、重炭酸化合物等の適当な緩衝液に溶解し、陰イオン交換樹脂カラムに吸着させる。陰イオン交換樹脂カラムとしては、一般に多糖類の分画に用いられる陰イオン交換樹脂カラムのいずれをも用いることができるが、特に、DEAE Sepharose 4B, E Sepharose 4B, DEAE Sepharose 6BまたはDEAE Sepharose 6Fを用いることが好ましい。

【0014】また、不飽和ウロン酸を含まないオリゴMを分離精製する場合には、陰イオン交換カラムクロマトグラフィーを行う前に、酵素反応液から不飽和ウロン酸を除去しておく。

【0015】次に、陰イオン交換カラムに吸着されたオリゴMを、重炭酸化合物溶液を用いて溶出する。重炭酸化合物としては、重炭酸アンモニウム、重炭酸ナトリウム、重炭酸カリウム等を用いることができる。溶出液の濃度は段階的または連続的に変化させてもよい。例えば

0Mから10Mの重碳酸アンモニウム溶液の直線濃度勾配を用いることができる(図2)。溶出液を分画して、重合度別に分離精製されたオリゴMが得られる。

【0016】本発明によるオリゴマンヌロン酸の分離方法は、スケールアップが可能であり、大量調製にも通している。

【0017】

【実施例】

(参考例) ポリMおよびオリゴMの製造

ポリMは、フラボバクテリウム マルチボラムK-11 (FERM P-11338) を培養して工業的に得られるアルギン酸分解酵素(ナガセ生化学工業(株)製、特開平第4-169189号)の粗酵素標品に含まれるG<sub>ae</sub>を用いて、アルギン酸を分解して調製した。粗酵素標品を、1Mリン酸緩衝液(pH 6~6.5)に溶解し、同緩衝液に対して透析した後、同緩衝液で平衡化した陽イオン交換樹脂に通し、非吸着画分を回収して、G<sub>ae</sub>として用いた。

【0018】アルギン酸ナトリウム(M/G=15) D<sub>g</sub>を0.1Mを含む水1に溶解し、pH 2.2に調整して37℃に加熱した。このアルギン酸溶液に酵素溶液5ml(10単位、1単位は、1分間に1μmolのβ-ホルミルピルビン酸を生成する酵素量である)を加えて、37℃で酵素反応を行わせた。酵素の活性測定は10%アルギン酸ナトリウム溶液と酵素液を1:1の割合で混合し、37℃で3分間反応を行い、10℃で5分で反応を止めた後、B反応(チオバルビツール反応)により酵素反応で生成したオリゴウロン酸の不飽和ウロン酸を定量することにより行った。

【0019】G<sub>ae</sub>の酵素反応は、37℃において2時間行った。酵素処理後は、10℃で1分間加熱処理し、放冷した。酵素反応処理液は、0.1M NaCl溶液を加えることによって、pHを10に調整し、4℃で一晩静置したのち、遠心分離を行い沈殿を得た。得られた沈殿を0.1M NaClを含む希塩酸で洗った後、水に懸濁し、希アルカリで中和した。得られた中和溶液をエタノール中に滴下

し、沈殿物を得た。この沈殿物は、エーテル処理により脱水し、減圧下で乾燥した。2gのポリMが得られた(M含量96%以上、回収率96%)。

【0020】次に、得られたポリMを、0.1M重碳酸アンモニウムに2%となるように溶かし、酵素(M<sub>ae</sub>、アワビアセトン粉末由来)をポリM1gに対して5単位となるように加えて反応させた。反応条件は37℃、2時間であった。酵素反応は、10℃5分間の加熱により終了させた。図1に得られたオリゴM混合物の薄層クロマトグラフィーの結果を示す。

【0021】(実施例1) オリゴMの分離精製  
参考例にしたがって得られたオリゴMを、0.1M重碳酸アンモニウムに溶解し、同溶液で平衡化させた陰イオン交換樹脂、モノQ(ファルマシア社製)に負荷した。0M~10Mの重碳酸アンモニウム溶液の直線濃度勾配を用いて溶出し、不飽和ウロン酸を含むオリゴマンヌロン酸を重合度別に分離精製した。図2に陰イオン交換クロマトグラフィーの結果を示す。

【0022】(実施例2) 不飽和ウロン酸を含まないオリゴMの分離精製  
参考例にしたがって得られたオリゴMの混合物を含む溶液を5%酸性(pH 3)にし、10℃、2時間加熱して不飽和ウロン酸を除去した。次にこれを中和して、実施例1と同様に陰イオン交換クロマトグラフィーにより処理した。なお、負荷量は、1オリゴマンヌロン混合物、流速1ml/minであった。その結果、不飽和ウロン酸を含まないオリゴMが、実施例1と同様に、重合度別に分離精製された。

【図面の簡単な説明】

【図1】図1はオリゴマンヌロン酸混合物の薄層クロマトグラフィーによる分析結果を示す。

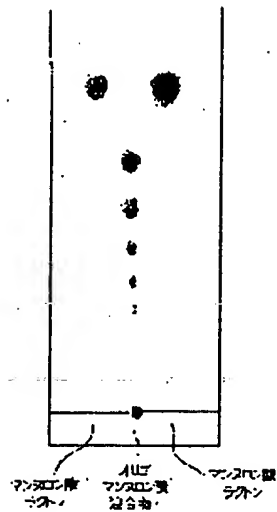
【図2】図2はオリゴマンヌロン酸の陰イオン交換クロマトグラフィーによる分離精製結果を示す。

【符号の説明】

△ 不飽和ウロン酸  
M マンヌロン酸

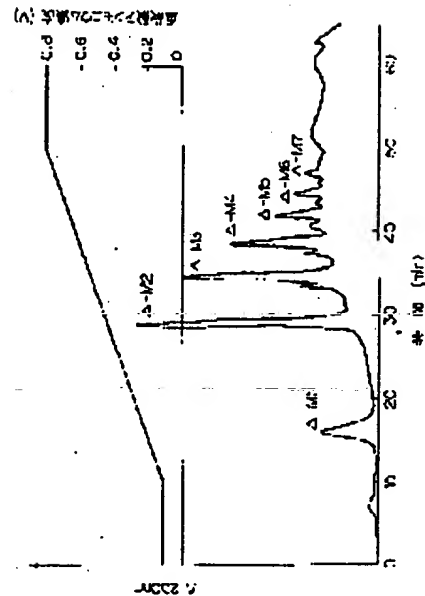
【図1】

オリゴマンシロン酸混合液のTLC分析



【図2】

オリゴマンシロン酸のイオン交換  
クロマトグラフィーによる電荷量



フロントページの続き

601105 識別記号 片内整理番号 F I  
C08B 32 Z 739-4C

技術表示箇所

発明者 吉田 滋樹  
茨城県つくば市松代5-5-51-88

発明者 村田 克巳  
埼玉県狭山市下奥富田2-95